

受賞者

山口 秀樹

宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野

研究テーマ

新たな摂食調節ホルモンNERPの機能解析と分子生物学的研究

### 1. はじめに

国立循環器病センターの佐々木、南野らは、組織、細胞が産生するペプチドの一斉解析(ペプチドーム解析)を行い、内在するペプチド総体をカタログ化した後、その中より構造特徴などにに基づき生理活性ペプチド候補を見出す方法を開発してきた。本法をヒト甲状腺髄様癌培養細胞株に適用した結果、最も有望と考えられた2種のペプチドが、NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide)である<sup>1)</sup>。本研究では、摂食・エネルギー代謝調節作用を有する新規生理活性ペプチドNERPの機能解析を行った。

### 2. 方法

#### 2.1 動物:

9~10週齢のWistar系雄ラット(日本チャールズ・リバー、横浜)は、室温・湿度を一定に保った12時間明暗サイクルの部屋に個別のケージにて自由摂餌・自由摂水で飼育した。オレキシン遺伝子欠損マウスは桜井武博士により分与頂いた。動物実験に関しては学内倫理委員会の承認を得て、当研究施設での動物実験指針に従い動物愛護の精神に基づいて行った。

#### 2.2 脳室内カニューレ挿入・留置法:

Pxinson & Watson の脳図譜に従い定位脳固定手術装置(ナリング(株)、東京)にラット頭蓋を固定し、側脳室(ラットはBregmaより後方0.8 mm、側方3.0 mm、脳表より1.8 mm、マウスはBregmaより後方0.2 mm、側方1.0 mm、脳表より2.5 mm)に直径0.9 mmのカニューレを挿入し、セメントで固定した。

#### 2.3 脳神経核内へのカニューレ挿入・留置と微量投与法:

10週齢のWistar系雄ラット片側の視床下部室傍核(Bregmaより後方1.7 mm、側方0.4 mm、脳表より7.0 mm)、弓状核(Bregmaより後方2.4 mm、側方0.3 mm、脳表より9.0 mm)、外側野(Bregmaより後方1.2 mm、側方1.2 mm、脳表より7.1 mm)にNERP 1.0 nmol / 0.2  $\mu$ lを微量投与し、NERPs投与した。

#### 2.4 免疫染色:

免疫染色は既報に従って行った<sup>1)</sup>。用いた抗体の最終濃度は、ラット/ヒト NERP-1 (1:2,500)、ラット NERP-2 (1:5,000)、goat anti-orexin-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:1,000)、chicken anti-MCH (Chemicon International, Temecula, CA, 1:2,000)であった。

#### 2.5 定量PCR法:

外側野を含む脳スライスを作製し、2mm直径の金属で外側野をパンチアウトし神経核を得た。RNAをTRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて抽出した。ラット *vgf* mRNA プライマー; 5'-CATCTTGTTGAGACTTTGAC-3' and 5'-AGGGACGGAGATGGACT-3' (GenBank accession number, M74223)と LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics)、LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて、定量PCRを施行した。

#### 2.6 摂食実験:

摂食実験は既報に従って行った<sup>1)</sup>。側脳室にや神経核内に留置したカテーテルを用いて薬剤やペプチドを投与し、投与後の摂餌量を測定した。

#### 2.7 自発運動量の測定:

自発行動量は、行動解析システム (infrared light-beam detectors、室町、東京)を用いて、脳室内投与30分から90分まで60分間のケージ内ビーム遮断回数を15分ごとに計測した。

#### 2.8 体温測定と酸素消費量の測定:

ラット体温は、直腸に挿入・留置したプローブを、酸素消費量はラット用代謝系計測システム (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Analyzer MM202R apparatus、室町、東京)を用いて測定した。

#### 2.9 統計解析

得られた結果は means  $\pm$  SEM で表記した。統計解析は ANOVA and *post-hoc* Fisher's test を用い、危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### ヒトおよびラットにおけるNERPの局在

ラット視床下部外側野に NERP-1 および NERP-2 陽性ニューロンを認めた (Fig. 1a, b)。NERP-2 は NERP-1 に比べ多数陽性ニューロンを認めた。外側野に存在する神経ペプチドである orexin-A と MCH との二重免疫染色で、NERP-2 は orexin-A と多く共存し、MCH との共存はわずかであった (Fig. 1c, d)。ヒト剖検で得られた視床下部外側野においても、NERP-2 陽性ニューロンを認めた (Fig. 1e)。ラット視床下部弓状核において、NERP-2 と orexin-A 陽性の神経線維を認め、二重染色にて NERP-2 と orexin-A の共存を認めた (Fig. 1h)。

#### NERP-2 の摂食亢進作用とそのシグナル伝達システム

48時間絶食負荷でラット視床下部外側野の *vgf* 遺伝子発現の増強を認め、再摂食2時間後に *vgf* 遺伝子発

現量は低下した (Fig. 2a)。自由行動下のラット側脳室に NERP を投与すると、NERP-2 は明期において用量依存的に摂餌量を亢進させ、その最少有効量は 0.1 nmol であった (Fig. 2b)。NERP-1 や NERP-2 の非アミド体である NERP-2-Gly は摂餌を亢進させなかった (Fig. 2b)。暗期直前での NERP-2 脳室内投与は摂餌量に影響を与えなかった (data not shown)が、暗期直前の抗 NERP-2 IgG の脳室内投与は、投与後 24 時間の摂餌量を抑制した (Fig. 2c)。抗 orexin-A/抗 anti-orexin-B IgGs の NERP-2 投与 3 時間前の脳室内投与は、NERP-2 による摂餌量亢進をキャンセルした (Fig. 3a)。オレキシン 1 受容体 (OX<sub>1</sub>R)の選択的拮抗薬の脳室内前投与は、NERP-2 の摂食亢進作用をキャンセルした (Fig. 3b)。また、NERP-2 の摂食亢進作用は、オレキシン遺伝子欠損マウスでは認められなかった (Fig. 3c)。AgRP IgG 抗体の脳室内前投与は NERP-2 による摂食亢進作用に影響を与えなかった (Fig. 3d)。NERP-2 の微量注入による摂食亢進作用は、弓状核 (ARC)への微量注入でのみ認め、室傍核 (PVN)や外側野 (LH)への投与では認められなかった (Fig. 4)。

#### NERP-2 の体温上昇作用と自発活動亢進作用

NERP-2 の脳室内投与は、投与後の直腸温を有意に上昇させた (Fig. 5a)。しかし NERP-1 や NERP-2 の非活性化型である NERP-2-Gly には体温上昇作用はなかった (Fig. 5a)。NERP-2 と orexin-A の脳室内投与は酸素消費量を有意に増加させたが、NERP-2-Gly や NERP-1 のその作用は認められなかった (Fig. 5b)。抗 NERP-2 IgG 抗体の脳室内投与は 正常ウサギ血清(NRS) IgG 抗体と比べて酸素消費量を有意に減少させた (Fig. 5c)。オレキシン 1 受容体 (OX<sub>1</sub>R)とオレキシン2受容体 OX<sub>2</sub>R の選択的阻害薬のラット脳室内前投与は、NERP-2 による自発運動の亢進をキャンセルした (Fig. 5d)。またマウスにおいても、NERP-2 の自発運動亢進作用はオレキシン遺伝子欠損マウスでは認められなかった (Fig. 5e)。

#### 4. 考察

新規生理活性ペプチドである NERP-2 は中枢投与により摂食を亢進する新たな生理活性ペプチドであり、その生理作用はオレキシンを介して機能することが明らかとなった。

NERP 前駆体たんぱくをコードする *vgf* 遺伝子欠損マウスは、代謝が亢進してやせを来すことが報告されている。これまで VGF 蛋白由来のペプチドが多数報告されるも、摂食亢進をきたすペプチドは同定されていなかった。本研究にて、ラット視床下部外側野での *vgf* 遺伝子発現が絶食で増加し再摂食で低下すること、摂食亢進中枢とされる視床下部外側野に NERP ペプチドがヒトやラットで局在することから、NERP が摂食エネルギー代謝調節に機能することが示唆された。NERP-1 の中枢投与は摂餌に影響を与えなかったが、NERP-2 の中枢投与は用量依存的に摂餌を亢進させた。抗 NERP-2 IgG の脳室内投与による中和実験で暗期の摂餌量が減少したことから、NERP-2 は内在性の摂食亢進ペプチドであることが明らかとなった。

視床下部外側野は摂食、覚醒などの自律神経系を統合する中枢である。外側野には摂食亢進をきたす 2 つの神経ペプチドであるオレキシンとメラニン凝集ホルモン (MCH)が局在し、オレキシンは覚醒、エネルギー代謝、情動、報酬や自律神経機能に関与する。摂食亢進をきたす NERP-2 は外側野においてオレキシンと共存することから機能連関が推定された。抗オレキシン抗体やオレキシン受容体拮抗薬の前投与で NERP-2 の摂食亢進がキャンセルされること、NERP-2 の摂食亢進作用がオレキシン遺伝子欠損マウスで認められないことから、NERP-2 の摂食亢進作用はオレキシンを介して機能することが明らかとなった。

NERP-2 は視床下部の外側野以外にも、弓状核や室傍核で NERP 陽性ニューロンを認めた (data not shown)。NERP-2 の摂食亢進作用の作用点を検討するため、NERP-2 の神経核内微量注入後の摂餌量を検討した。その結果、NERP-2 の微量注入による摂食亢進作用は弓状核でのみ認め室傍核や外側野では認められず、NERP-2 摂食亢進の作用点は弓状核であることが明らかとなった。弓状核は、外側野に局在するオレキシンニューロンがその神経線維を投射している神経核で、オレキシンの摂食亢進に重要な神経核とされている。NERP-2 はオレキシンを介して摂食亢進を発揮するが、オレキシンニューロンが局在する外側野で機能するのでなく、オレキシンの投射先である弓状核で NERP-2 の摂食亢進作用が発揮されることが明らかとなった。

オレキシンは摂食のみならず、自発行動、酸素消費量や体温に影響するため、NERP-2がオレキシンを介して作用するかを検討した。NERP-2の中枢投与は体温や酸素消費量を増加させ、抗NERP IgG抗体の投与は酸素消費量を減少させることから、NERPがエネルギー代謝亢進作用を有することが明らかとなった。NERP-2-Glyにはその作用がなく、C端のアミド化がNERPの機能発現に必須であった。NERP-2の自発運動亢進作用は野生型マウスでは認められたが、オレキシン受容体拮抗薬の前投与やオレキシン遺伝子欠損マウスではみられず、オレキシンを介してNERP-2の機能が発揮されることが明らかとなった。

NERP の受容体は未同定であるため、Orphan GPCR (G 蛋白共役型受容体)や各種イオンチャネルをスクリーニングし、NERP の細胞内シグナル情報伝達機構を明らかにすることは重要な課題である。今後 NERP の基礎的な機能解析を進めるとともに、NERP が抗利尿ホルモン(AVP)分泌過剰症の病態に関与するかを探索し臨床医学へフィードバックしたい。

#### 5. 文献

1. Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, and Minamino N  
Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem* 282: 26354-26360, 2007.

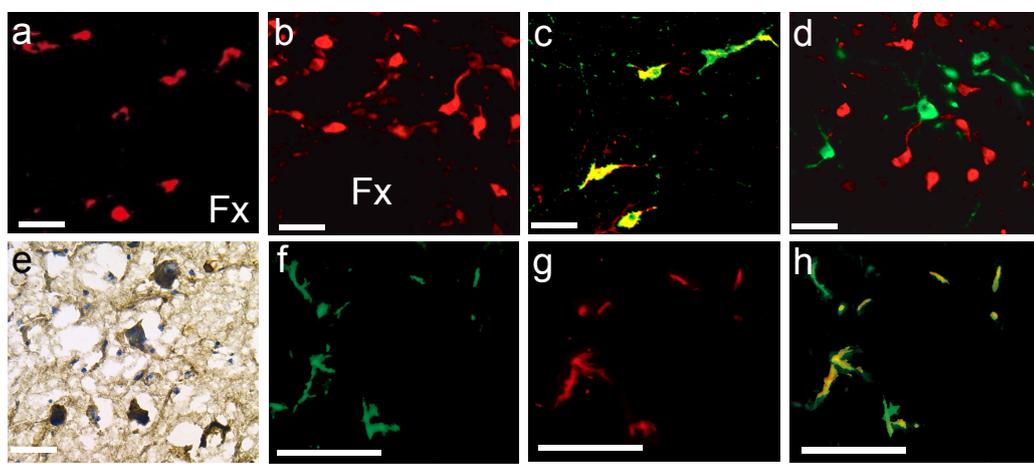


Fig. 1. Immunofluorescence staining for NERP-1 (a) and NERP-2 (b) in the rat LH. Double immunofluorescence staining for NERP-2 (red) and either orexin (c) or MCH (d) (in green) in the rat LH. e, Immunostaining of NERP-2 (blue-black) in the human LH. Immunoreactive fibers of NERP-2 (f) and orexin-A (g) in the rat ARC. h, Co-localization of NERP-2- and orexin-A-immunoreactive fibers. Fx, Fornix. Scale bars: 50  $\mu$ m.

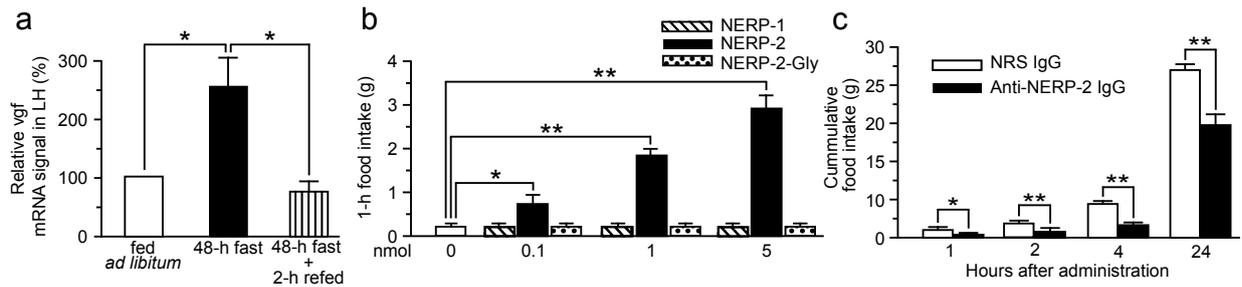


Fig. 2. a, Quantitative RT-PCR analysis of *vgf* mRNA levels normalized to ribosomal RNA levels in the LH of rats that fasted for 48 h or fasted for 48 h with a 2-h refeeding period. \* $P < 0.05$ . b, Food intake of rats fed *ad libitum* after an icv injection of NERP peptides. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ . c, Reduction of food intake after treatment with anti-NERP-2 IgG. Free-feeding rats received 0.5  $\mu$ g anti-NERP-2 IgG or NRS IgG icv at 17:00. Food intake was measured from 1 to 24 h after the start of the dark phase at 20:00. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

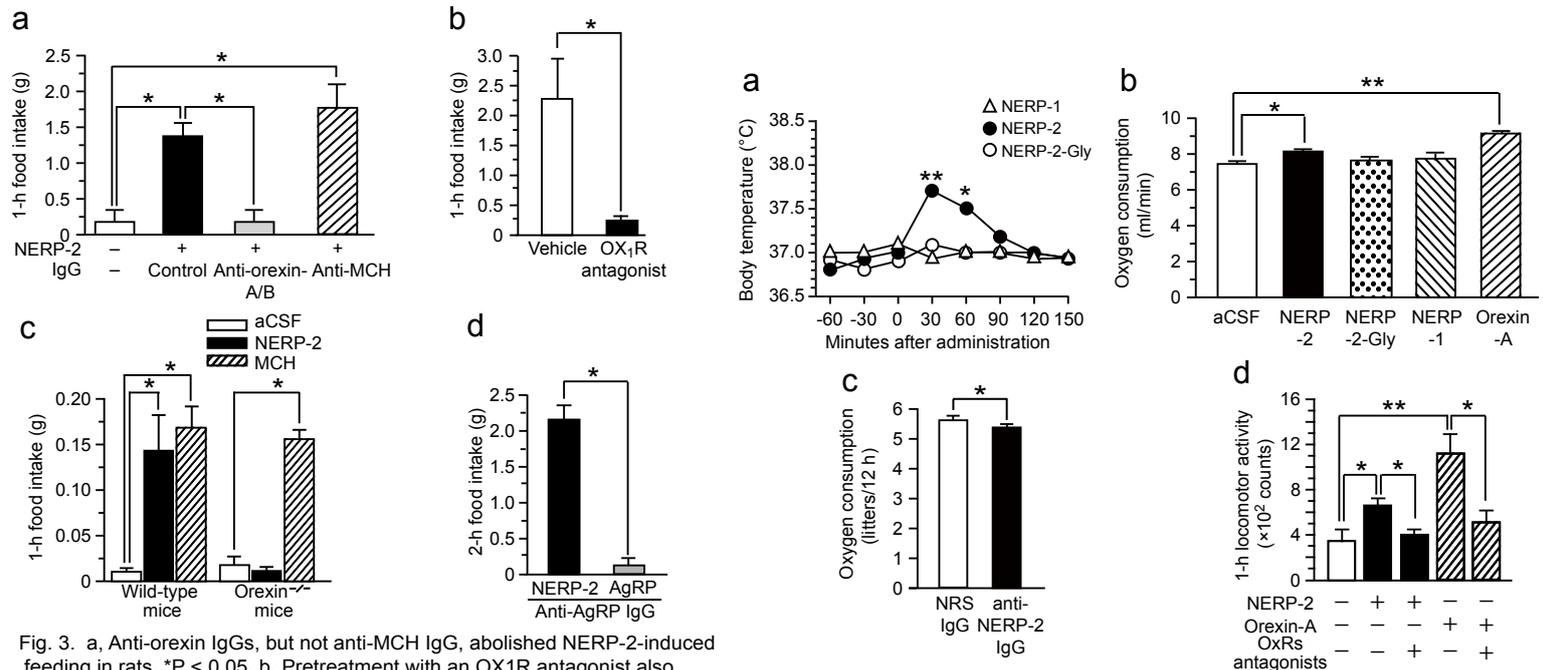


Fig. 3. a, Anti-orexin IgGs, but not anti-MCH IgG, abolished NERP-2-induced feeding in rats. \* $P < 0.05$ . b, Pretreatment with an OX1R antagonist also abolished NERP-2-induced feeding in rats. \* $P < 0.001$ . c, Food intake of orexin-deficient mice and wild-type littermates following an icv injection of NERP-2 or MCH. \* $P < 0.05$ . d, AgRP neutralization had no effect on NERP-2-induced feeding. \* $P < 0.01$ .

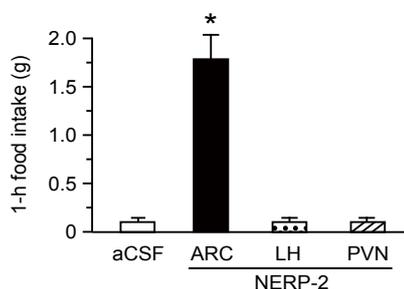


Fig. 4. NERP-2 (15 pmol each side) was administered to the ARC, LH, or PVN. NERP-2 administration to the ARC, but not the LH or PVN, increased food intake. \* $P < 0.001$  vs. aCSF, LH and PVN.

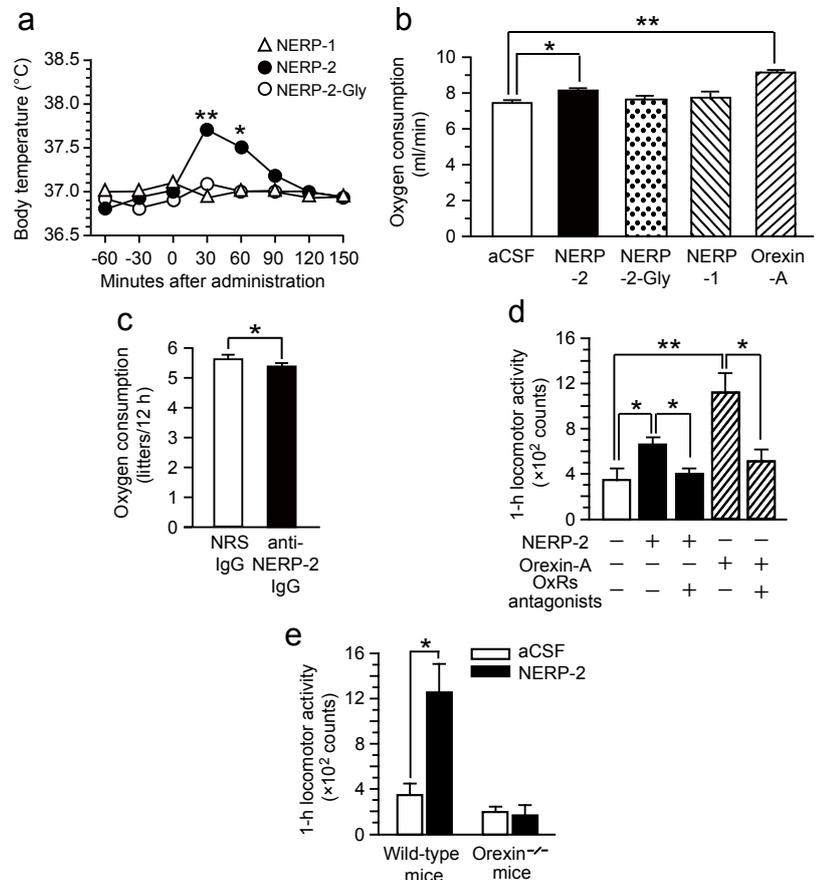


Fig. 5. a, Body temperature increased following icv administration of NERP-2, but not NERP-2-Gly or NERP-1. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  vs. NERP-2-Gly and NERP-1. b, Oxygen consumption increased after icv administration of NERP-2 or orexin-A, but not NERP-2-Gly or NERP-1. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . c, Reduction in oxygen consumption after anti-NERP-2 IgG treatment. \* $P < 0.01$ . d, Effect of OX1R and OX2R antagonist co-administration on NERP-2- and orexin-A-induced locomotor activities in rats. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . e, Locomotor activity of orexin-deficient mice and wild-type littermates after icv administration of NERP-2. \* $P < 0.01$ .